

① BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑪ DE 3834233 A1

⑤ Int. Cl. 5:
C12 Q 1/56

⑳ Aktenzeichen: P 38 34 233.2
㉔ Anmeldetag: 7. 10. 88
㉕ Offenlegungstag: 19. 4. 90

DE 3834233 A1

㉑ Anmelder:

Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften eV, 3400 Göttingen, DE

㉒ Vertreter:

Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys.
Dr.; Weickmann, F., Dipl.-Ing.; Huber, B.,
Dipl.-Chem.; Liska, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Prechtel,
J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000
München

㉓ Erfinder:

Klöß, Hans-Rudolf, 6315 Mücke, DE;
Müller-Berghaus, Gert, Prof. Dr.; Selmayr, Eberhard,
Dr., 6300 Gießen, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤ Verfahren zur Aktivitätsbestimmung von Transglutaminasen

Zur Bestimmung der Aktivität von Transglutaminasen inkubiert man eine Lösung eines physiologischen Substrates der zu bestimmenden Transglutaminase, welches eine Markierung trägt, mit einem in fester Phase vorliegenden Substrat des Enzyms in Gegenwart der zu untersuchenden Probe, trennt die Phasen und bestimmt die in der festen oder in der flüssigen Phase vorliegende Markierung als Maß der Transglutaminase-Aktivität.

DE 3834233 A1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Transglutaminasen in Plasma, Zellen und Geweben durch Quervernetzung spezifischer markierter Proteinsubstrate und Verfahren zur Herstellung der markierten Substrate. Das erfindungsgemäße Bestimmungsverfahren kann angewendet werden, um bestimmte Erkrankungen zu erkennen, einen Krankheitsverlauf zu überwachen oder eine Therapie zu kontrollieren.

Als Transglutaminasen werden die Mitglieder einer Familie von Enzymen bezeichnet, von welchen bekannt ist, daß sie extrazellulär und intrazellulär Moleküle von verschiedenen Strukturproteinen durch enzymatische Knüpfung einer ϵ -(γ -Glutamyl)Lysyl-Bindung kovalent vernetzen (Übersichten: a. Lorand L. und Conrad, S. M., *Transglutaminases, Molecular and Cellular Biochemistry* 58: 9–35 (1984); b. Folk, J. E. und Finlayson, J. S., *The ϵ -(γ -glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases, Advances in Protein Chemistry* 31: 1–33 (1977)).

Das wichtigste Enzym der Transaminasenfamilie ist der Blutgerinnungsfaktor XIII. Als Substrate sind bekannt: Fibrin, Fibronectin, α_2 Plasmininhibitor, Thrombospondin, Collagen, α_2 -Makroglobulin, von Willebrand-Faktor, Faktor V, Aktin und Myosin.

Transglutaminasen sind beteiligt bei Blutgerinnung, Thrombosen, Regulation der Fibrinolyse, Verbrauchskoagulopathie, Wundheilung, Tumormetastasierung, Arteriosklerose, kongenitaler Faktor XIII-Mangel, Spontanaborten, Rheuma, entzündlichen und immunologischen Erkrankungen. Daher besteht ein Bedarf an einer schnellen und genauen Bestimmung dieser Enzyme.

Mehrere Verfahren zur Bestimmung von Faktor XIII sind bekannt:

a) Bestimmung der Löslichkeit von Fibrin-Testgerinnseln durch verdünnte Säuren oder Harnstoff (Übersicht: Rasche, H., *Blutgerinnungsfaktor XIII und Fibrinstabilisierung. Klinische Wochenschrift* 53: 1137–1145 (1975)). Diese Methoden jedoch messen nur semiquantitativ und sind daher nur zur Diagnose bei ausgeprägtem Faktor XIII-Mangel anwendbar.

b) Inkorporation von radioaktiven oder fluoreszierenden Aminen in Casein. Faktor XIII activity using dansylcadaverin incorporation and gel filtration. *Thrombosis Research* 36: 123–131 (1984); b) Muscbeck, L., Polgar, J., Fusus, L., *Kinetic determination of blood-coagulation Faktor XIII in plasma. Clinical Chemistry* 31: 35–40 (1985)).

Diese Methoden messen präzise, sind aber sehr aufwendig, langwierig und nur für kleine Probenzahlen anwendbar.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Reagenz bzw. Verfahren zu entwickeln, um die enzymatische Aktivität von Transglutaminasen und insbesondere Faktor XIII spezifisch und quantitativ zu bestimmen. Der Test sollte einfach und schnell durchführbar sein und eine große Anzahl von Proben mit großer Genauigkeit parallel erfassen können.

Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Transglutaminasen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine Lösung eines physiologischen Substrates der

zu bestimmenden Transglutaminase, welches eine Markierung trägt, mit einem in fester Phase vorliegenden Substrat des Enzyms in Gegenwart der zu untersuchenden Probe inkubiert, die Phasen trennt und die in der festen oder in der flüssigen Phase vorliegende Markierung als Maß der Transglutaminase-Aktivität bestimmt.

Als Transglutaminasesubstrat kann im Rahmen der Erfindung jedes physiologische Substrat der jeweils interessierenden Transglutaminase verwendet werden. Für die Bestimmung der physiologisch besonders wichtigen Transaminase Blutgerinnungsfaktor XIII eignen sich die oben erwähnten Substrate Fibrin, Fibronectin, α_2 Plasmininhibitor, Thrombospondin, Collagen, α_2 -Makroglobulin, von Willebrand-Faktor, Faktor V, Aktin und Myosin. Besonders bevorzugt wird Fibrin als in situ-Substrat in Form von Fibrinogen, aus dem während der Bestimmung durch Thrombineinwirkung Fibrin entsteht, verwendet.

In der flüssigen wie in der festen Phase wird vorzugsweise das gleiche Enzymsubstrat verwendet, obwohl dies nicht erfindungswesentlich ist und es allein darauf ankommt, daß das Substrat von dem jeweils zu bestimmenden Enzym überhaupt als Substrat verwendet wird. Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens verknüpft das Enzym in einer Art Vernetzungsreaktion die beiden Substrate, das in der flüssigen Phase vorliegende markierte Substrat und das an der festen Phase gebundene Substrat, miteinander. Nach Trennung der Phasen kann das durch die Vernetzungsreaktion an die feste Phase gebundene markierte Substrat anhand seiner Markierung bestimmt werden. Die Menge an vernetztem markiertem Substrat korreliert dabei der gesuchten Enzymaktivität. Setzt man dabei eine bekannte Menge an markiertem gelöstem Substrat ein, so kann auch die in Lösung verbliebene Substratmenge als Maß für die Bestimmung der Enzymaktivität herangezogen werden. Zur Markierung geeignet sind beispielsweise radioaktive Isotope wie z.B. Jodisotope, Farbstoffe, Fluoreszenzfarbstoffe, Enzyme, sowie die Partner von physiologischen Bindungspaaren wie z.B. Biotin/Streptavidin oder Antigen/Antikörper. Bevorzugt wird im Rahmen der Erfindung als Markierung einer der Partner des Bindepaares Biotin/Streptavidin. Der Nachweis kann dann in an sich bekannter Weise mit dem anderen Bindepartner, der in eine bestimmbare Form gebracht wird, erfolgen, beispielsweise durch Kupplung an ein bestimmtes Enzym wie Peroxidase. Daher wird bevorzugt im Rahmen der Faktor XII-Bestimmung als markiertes lösliches Substrat Biotin/Fibrinogen verwendet und mit einem Peroxidase-Streptavidin-Konjugat unter Anwendung der üblichen Peroxidase-Bestimmungsmethode nachgewiesen. Die Bestimmung von Peroxidase über Farbreaktionen ist dem Fachmann geläufig und bedarf hier keiner näheren Beschreibung.

Zur Markierung der gelösten Substrate mittels Biotin hat sich besonders Biotin- ϵ -Aminocapronsäure-N-hydroxysuccinimid-Ester (B-X-NHS) als vorteilhaft erwiesen, da es die biologische Aktivität der empfindlichen Substrate wie z.B. Fibrinogen aufrecht erhält. Für die Verwendung als Substrat wird Fibrinogen zweckmäßig in gereinigter Form verwendet. Zur Reinigung eignet sich insbesondere das Verfahren gemäß Mahn, I. und Müller-Berghaus, G., *Studies on catabolism of 125-I-labelled fibrinogen in normal rabbits and in rabbits with indwelling intravenous catheters: Methodologic aspects. Haemostasis* 4: 40–50 (1975)).

Wird beim Verfahren der Erfindung die an die feste Phase durch die Vernetzungsreaktion gebundene Mar-

kierung bestimmt, so hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die feste Phase mit einer gepufferten Lösung einer chaotropen Substanz, insbesondere mit einer Harnstofflösung oder mit verdünnter Säure von nicht gebundenem löslichem Substrat zu reinigen.

Als feste Phase und Träger des in fester Phase vorliegenden Substrates eignen sich die üblicherweise für Enzymreaktionen geeigneten Substrate wie z.B. Trägermaterial auf Basis von Kohlenhydraten wie Agarose, Cellulose, Stärke oder dgl. oder auf Basis von Kunststoffen, wie sie insbesondere für Mikrotiterplatten verwendet werden. Die Bindung des Substrates an den festen Träger kann adsorptiv, durch Ausbildung einer kovalenten Bindung mit dem Substrat oder durch Vernetzung des Substrats auf der Trägeroberfläche erfolgen. Aufgrund der Einfachheit der Herstellung und der unmittelbaren Anwendbarkeit für das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich besonders die adsorptive Bindung an Mikrotiterplatten.

Um unspezifische Bindungen von löslichem Substrat zu unterdrücken, wird die Trägeroberfläche vorteilhaft mit einem nicht quervernetzbaaren unspezifischen Protein wie Rinder Serumalbumin oder Milchprotein behandelt bzw. beschichtet.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenz zur Bestimmung der Aktivität von Transglutaminasen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es ein festphasengebundenes physiologisches Transglutaminasesubstrat und ein wasserlösliches markiertes physiologisches Transglutaminasesubstrat enthält.

Das festphasengebundene Substrat wird zweckmäßigerweise hergestellt unter Verwendung einer Lösung, die etwa 0,1 bis 10 mg/l Substrat enthält und mit dem festen Träger kontaktiert wird unter Bindung des Substrats. Bei adsorptiver Bindung am Träger führt dies zu einer ausreichenden Beladung desselben. Bei Mikrotiterplatten als Träger und adsorptiver Bindung ergaben 0,5 bis 5 g Substrat/ Napf (well) gute Ergebnisse. Das lösliche markierte Substrat wird allgemein in einer Konzentration von 0,05 bis 10 mg/ml, vorzugsweise 0,5 bis 2 mg/ml eingesetzt.

Ein bevorzugtes Reagenz, welches für die Aktivitätsbestimmung von Faktor XIII geeignet ist, enthält an eine feste Phase gebundenes Fibrinogen, markiertes lösliches Fibrinogen und Thrombin.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält dieses Reagenz als lösliches Substrat Biotin-Fibrinogen, sowie, vor Gebrauch davon getrennt, Streptavidin-Peroxidase-Konjugat und ein Nachweissystem für Peroxidase.

Durch die Erfindung wird eine einfache, rasch durchführbare Bestimmung der Transglutaminasen-Aktivität ermöglicht, die für die Diagnose und die Therapie einer mit den Transglutaminasen verbundenen Erkrankungen vorteilhaft angewendet werden kann.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung in Verbindung mit der beigefügten Zeichnung weiter. In dieser stellen dar:

Fig. 1 eine graphische Darstellung der im Peroxidasesubstrat gemessenen Adsorption gegen die Zeit bei der in Beispiel 1 beschriebenen Bestimmung der Faktor XIII-Aktivität,

Fig. 2 eine Eichkurve zur Bestimmung der Faktor XIII-Aktivität in Plasmaproben gemäß Beispiel 2, bei der die Faktor XIII-Aktivität als Prozent bezogen auf 100% Poolplasma angegeben ist.

Bestimmung der Faktor XIII-Aktivität

A) Herstellung eines Biotin-Fibrinogen-Konjugates als lösliches Substrat

B-X-NHS wird in 30% Dimethylformamid gelöst. Die Fibrinogenlösung hat eine Konzentration von 2 mg/ml.

Gleiche Volumenteile der beiden Lösungen werden zusammengegeben und reagieren 4 Stunden bei 21°C. In dieser Zeit erfolgt die Verknüpfung von Biotin-X-Molekülen mit den Amingruppen des Fibrinogens. Die Lösung biotinierten Fibrinogens wird anschließend bei 4°C über Nacht gegen einen phosphathaltigen Puffer dialysiert. Nicht konjugiertes B-X-NHS wird durch Gelfiltration auf Sephadex G 25 entfernt.

Das eingesetzte molare Verhältnis Biotin : Fibrinogen beträgt 5 : 1 während der Konjugation. Nach 4 Stunden Reaktionszeit sind 60% des B-X-NHS gekoppelt, d.h. ein Fibrinmolekül trägt 2 bis 3 Biotinmoleküle.

Niedere oder höhere Konjugationszeiten sowie Veränderungen des molaren Verhältnisses Biotin:Fibrinogen haben sich als weniger günstig erwiesen.

B) Herstellung des in fester Phase vorliegenden Substrats

Pro Testansatz werden 20:1 einer Fibrinogenlösung mit 1 mg/ml für 2 Std. auf Mikrotiterplatten adsorbiert. Nach einem Waschschrift mit Kalziumhaltigem Puffer werden freie Bindungsstellen mit 5% Rinder-Serum-Albumin für 2 Stunden abgesättigt und dann nochmals gewaschen.

C) Durchführung der Aktivitätsbestimmung
100 µl Probeflösung (Plasma, Zellysate, Gewebeextrakte) werden in jede Vertiefung der nach B hergestellten Mikrotiterplatte vorgelegt, 100 µl Biotin-Fibrinogen zugegeben, gemischt und die Transamidierung durch Zugabe von 50 µl Rinderthrombin (5 NIHU ml in 20 mM CaCl₂) gestartet. Nach 5minütiger Inkubationszeit werden alle nicht kovalent gebundenen Biotin-Fibrin-Moleküle durch einen 4 M Harnstoffpuffer ausgewaschen. Zu Detektierung der verbliebenen Biotin-Fibrin-Moleküle wird eine Streptavidin-konjugierte Peroxidase in bekannter Weise am Biotin-Fibrin gebunden und die Änderung der optischen Dichte einer Lösung von Peroxidasesubstrat gemessen.

Beispiel 2

Faktor XIII-Bestimmung in humanen Plasmaproben

Auf der gleichen Mikrotiterplatte, auf der auch die zu untersuchenden Plasmaproben gemessen werden, erfolgt zunächst die Bestimmung der Faktor XIII-Aktivität von Poolplasmaproben in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (molares Verhältnis Poolplasma : Verdünnungspuffer 1 : 10, 1 : 15, 1 : 20 und 1 : 30). Trägt man die Extinktionswerte der Proben gegen die Meßzeit in einem Diagramm auf, ergeben sich Kurvenverläufe, deren Absolutwert umso höher ist, je konzentrierter das jeweils verwendete Poolplasma war (Fig. 1). Zur Gewinnung einer Eichkurve werden in einem weiteren Diagramm die Extinktionswerte zum Zeitpunkt 120 Minuten gegen das Verdünnungsverhältnis der Proben auf-

getragen (Fig. 2). Durch Ablesen der 120 Minuten-Werte der im molaren Verhältnis Plasmaprobe : Verdünnungspuffer 1 : 10 verdünnten Plasmaproben erhält man Prozentwerte der in der jeweiligen Probe enthaltenen Thrombin-induzierbaren Faktor XIII-Aktivität bezogen auf das verwendete Poolplasma.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Transglutaminasen, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Lösung eines physiologischen Substrates der zu bestimmenden Transglutaminase, welches eine Markierung trägt, mit einem in fester Phase vorliegenden Substrat des Enzyms in Gegenwart der zu untersuchenden Probe inkubiert, die Phasen trennt und die in der festen oder in der flüssigen Phase vorliegende Markierung als Maß der Transglutaminase-Aktivität bestimmt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man in flüssiger und in fester Phase das gleiche Enzymsubstrat verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man als Substrat für die Transglutaminase Faktor XIII Fibrinogen verwendet und in Gegenwart von Thrombin inkubiert.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als Markierung einen Partner des Bindepaares Biotin/Streptavidin verwendet und die Markierung mit einem Konjugat aus dem anderen Bindungspartner und einem nachweisbaren Enzym bestimmt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man als Markierungsenzym Peroxidase verwendet.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die an die feste Phase gebundene Markierung bestimmt und nicht kovalent gebundenes markiertes Substrat durch eine gepufferte Lösung chaotroper Substanzen, insbesondere eine Harnstofflösung oder verdünnte Säure von der festen Phase entfernt.
7. Reagenz zur Bestimmung der Aktivität von Transglutaminasen, dadurch gekennzeichnet, daß es ein festphasengebundenes physiologisches Transglutaminasesubstrat und ein wasserlösliches markiertes physiologisches Transglutaminasesubstrat enthält.
8. Reagenz nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es zum Nachweis von Faktor XIII an eine feste Phase gebundenes Fibrinogen, markiertes lösliches Fibrinogen und Thrombin enthält.
9. Reagenz nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das lösliche markierte Fibrinogen ein Fibrinogen-Biotin-Konjugat ist und getrennt davon Streptavidin-konjugierte Peroxidase und Peroxidasesubstrat enthält.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

60

65

Abb. 1

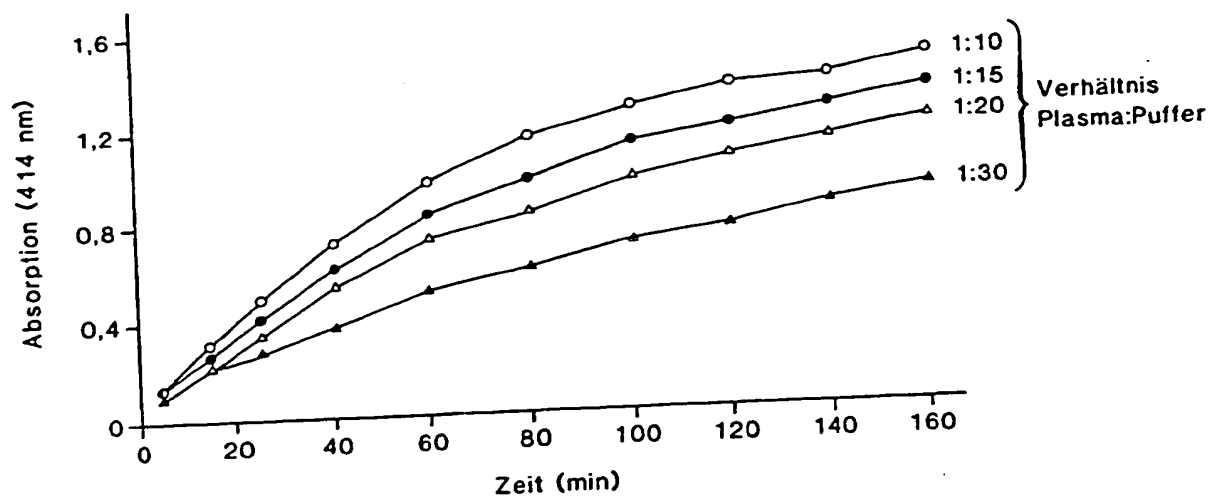


Abb. 2

